ノート

ニワトリおよびブタ組織中のスペクチノマイシンの
HPLC による残留分析

(平成 14 年 8 月 16 日受理)

浜本好子^{*,†} 水野安晴^{*} 小池良治^{*}
山岡良三^{*} 高橋敏雄^{*} 高橋美幸^{*}Residue Analysis of Spectinomycin in Tissues of
Chicken and Swine by HPLCKouko HAMAMOTO^{*,†}, Yasuharu MIZUNO^{*}, Ryoji KOIKE^{*}, Ryozo YAMAOKA^{*},
Toshio TAKAHASHI^{*} and Yoshiyuki TAKAHASHI^{*}(*National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries:
1-15-1, Tokura, Kokubunji, Tokyo 185-8511, Japan; † Corresponding author)

A reversed-phase HPLC method with ultraviolet detection using *p*-nitrophenyl hydrazine as a pre-column derivatizing reagent was investigated for the determination of the antibiotic spectinomycin (SPCM) in muscle, liver, kidney and fat of chicken and swine. SPCM was extracted from samples with 10% trichloroacetic acid saturated with EDTA-2Na, and then cleaned up with coupled Sep-Pak Plus PS-2 cartridges. The detection limit of SPCM was 0.02 µg (potency)/g. Recoveries of SPCM ranged from 77.4 to 97.4% for chicken tissues and from 74.5 to 91.8% for swine tissues. The present method was used for the analysis of chicken tissues after the 11th day of withdrawal (SPCM-medicated drinking water : 500 mg (potency)/L, for 7 days), and swine tissues after the 14th day of withdrawal (SPCM-medicated feed: 100 mg (potency)/kg, for 7 days). Results showed that SPCM concentrations were lower than the MRLs in all tissues.

(Received August 16, 2002)

Key words: スペクチノマイシン spectinomycin; パラニトロフェニルヒドラジン *p*-nitrophenyl-hydrazine; 高速液体クロマトグラフィー HPLC; 残留 residue; ニワトリ chicken; ブタ swine

緒 言

スペクチノマイシン (decahydro-4*a*,7,9-trihydroxy-2-methyl-6,8-bis(methylamino)-4*H*-pyrano[2,3-*b*][1,4]benzodioxin-4-one:SPCM) (Fig. 1) は, アミノグリコシド系抗生物質で, マイコプラズマ, 大腸菌, サルモネラおよびアクチノバチルスに抗菌性を有し, 国内ではニワトリの呼吸器性マイコプラズマ病, 大腸菌症およびブタ胸膜肺炎の治療に用いられている. 平成 13 年 3 月 23 日に, 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会乳肉水産食品・毒性合同部会^{*1}より, SPCM の残留基準値案が答申された. 農林水産省では, 厚生労働省の残留基準値 (MRL) の設定に伴って, 動物に動物用医薬品を用いる場合の使用禁止期間¹⁾の設定

または見直しを行っていることから, SPCM 製剤を用法用量に従って使用した場合の使用禁止期間を確認する必要がある. しかし, 厚生労働省から提出される SPCM の残留検査法 (公定法) が未公開であったため, 残留試験法の検討を行った.

答申された SPCM の残留基準値案では, ニワトリおよびブタの残留基準値 (MRL) は, 筋肉, 腎臓, 肝臓, 脂肪でそれぞれ 0.5, 5.0, 2.0, 2.0 ppm であった. SPCM の定量法は, 微生物学的試験法²⁾が日本抗生物質医薬品基準³⁾に規定されているが, 検出感度が低い. また, GC⁴⁾とし

Fig. 1. Structure of spectinomycin

† 連絡先

* 農林水産省動物医薬品検査所: 〒185-8511 東京都国分寺市戸倉 1-15-1

*¹ 厚生労働省 (2001), 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会乳肉水産食品・毒性合同部会 (平成 13 年 3 月 23 日開催) の検討結果概要などについて, <http://www.mhlw.go.jp/houdou/0103/h0323-2.html>

ては、トリメチルシリル化して検出する方法が報告されており、HPLCにおいては、SPCMにUV吸収がないので、種々の誘導体化法^{5)~9)}を用いた製剤中、血漿中および組織中のSPCM定量分析法やLC/MSを用いた組織中の残留分析法¹⁰⁾が報告されている。LC/MSは一般的ではないので、著者らは誘導体化によるHPLCのうち、大口ら⁸⁾の方法に従って試験を行ったところ、固相抽出ミニカラムによる精製において、検体負荷後の水洗いでSPCMが溶出したことにより、回収率が低かった。そこで、固相ミニカラムによる精製法を改良し、Sep-Pak Plus SP-2カートリッジを用い、0.001 mol/Lの塩酸溶液で溶出することで、きょう雑物の少ないHPLCを確立できた。

また、ニワトリおよびブタに市販のSPCM製剤を経口投与し、現行の休薬期間終了時にと殺採材し、MRL対象部位で残留基準値以下であることを確認する試験を行ったので報告する。

実験方法

1. 動物試験および試料

ニワトリ：体重325~520 gの白色レグホーン種のニワトリ22羽を、室温で飼育した。8日間、中すう用SD飼料（日本配合飼料(株)製、試験用の薬剤無添加飼料）を不断給餌し、自由飲水にて飼育後、投薬した。飼料は馴化期間と同様に給餌し、スペクチン水溶液（アボットラボラトリーズ社製）は飲水1 L当たりSPCM500 mg(力価)となるように溶解後、飲水器から自由に摂取させ、毎朝交換および計量し、7日間投薬した。製剤中のSPCM含量を動物用抗生物質医薬品基準（動抗基）¹¹⁾の塩酸スペクチノマイシン散の方法に準じて定量した結果は、106.3%であった。休薬11日目にと殺し、筋肉、肝臓、腎臓および脂肪を採取した。採取した組織は、分析まで-80℃で凍結保存し、抽出操作に十分な量の組織を採取できた3個体について定量を行った。コントロール（無投薬）試料は、同じ由来、同じ飼料で別途飼育したニワトリから採取した。

ブタ：中ヨークシャー種のブタ3頭（試験開始時の体重：平均73.1 kg）を、室温で飼育した。7日間、朝1回子ブタ用SD飼料（日本配合飼料(株)製、試験用の薬剤無添加飼料）を給餌し、自由飲水にて飼育後、投薬した。子ブタ用SD飼料1 kg当たりスペクチン20（メルシャン(株)製）をSPCMとして100 mg(力価)となるように均一に混合したSPCM添加飼料（日本配合飼料(株)で混合）を、朝1回投与および計量し、飲水は自由飲水として7日間投薬した。製剤中のSPCM含量を動抗基¹¹⁾の塩酸スペクチノマイシン散の方法に準じて定量した結果は、107.3%であった。休薬14日目にと殺し、筋肉、肝臓、腎臓および脂肪を採取した。採取した組織は、分析まで-80℃で凍結保存した。コントロール（無投薬）試料は、同じ由来、同じ飼料で別途飼育したブタから採取した。

2. 試薬

塩酸スペクチノマイシン標準品（646 μg(力価)/mg）は動薬検配布品を用いた。パラニトロフェニルヒドラジン（*p*-NPH）は、和光純薬工業(株)製の化学用を用いた。他の試薬は、すべて和光純薬工業(株)製試薬特級を用いた。

p-NPH飽和エタノール溶液：エタノール100 mLに適量の*p*-NPHを加えて沸騰水浴中で加温して溶解した後、室温に放冷した。析出した結晶をろ過したる液を*p*-NPH飽和エタノール溶液として用いた。

抽出溶媒：EDTA-2Naの3.7 g/35 mL水溶液を10%トリクロル酢酸1 Lに加え、混合後の上清を用いた。

標準溶液：SPCM標準品を0.1 mol/Lリン酸塩緩衝液（動抗基¹¹⁾：pH 8.0）に溶解し、100 μg(力価)/mLの標準原液を作製し、同緩衝液で用時希釈して0.25~10.0 μg(力価)/mLの標準溶液を調製した。

3. 装置

ホモジナイザー：(株)マイクロテック・ニチオン製NS-50型、Sep-Pak Plus PS-2カートリッジ：ウォーターズ社製；ポンプ：日本分光(株)製PU950型；検出器：日本分光(株)製UV-970型、オートインジェクター：日本分光(株)製AU-950型；カラムオープン：日本分光(株)製CO-965型；インテグレーター：日本分光(株)製LCSS-905型を用いた。

4. HPLC測定条件

カラムは東ソー(株)製TSK-gel ODS-80TM (4.6 mm i.d.×250 mm)を用い、移動相はアセトニトリル-水-酢酸=73:26:0.5を用いて流速1 mL/minで溶出させた。カラム温度は40℃で行い、*p*-NPH飽和エタノール溶液で反応させたSPCMを波長420 nmで検出した。試験溶液の注入量は30 μLで行った。

5. 試験溶液の調製

(1) 抽出

均一に細切した試料2.0 gに抽出溶媒15 mLを加え、1分間ホモジナイズした後、3,000 rpmで5分間遠心分離し、上清を分取した。このとき、脂肪などの試料は、綿栓ろ過した。残さに抽出溶媒を15 mL加え、肝臓の試料は軽くほぐしてから、10分間激しく振とうした後、3,000 rpmで5分間遠心分離して、上清を分取し、以前の上清と合わせた。脂肪などの試料は、上述同様に綿栓ろ過した。合わせた上清のpHは、pHメーター（東亜電波工業(株)製HM40S型）を用いて、10 mol/L水酸化ナトリウム溶液で8.0±0.1に調整した後、メタノール10 mLと水10 mLおよびEDTA-2Na飽和水溶液10 mLで前処理した2連のSep-Pak Plus PS-2カートリッジに負荷した。このカートリッジを水10 mLで洗浄した後、0.001 mol/Lの塩酸15 mLをカートリッジに流してSPCMを溶出させた。負荷および洗浄時の流速は、通常よりやや遅い0.5~1.0 mL/minで行った。溶出液は、40℃以下で減圧乾固し、残留物を1.0 mLの0.1 mol/Lリン酸塩緩衝液（pH 8.0）で溶解して、誘導体化用の試料溶液とした。脂肪

および肝臓の添加回収試験試料は同緩衝液 2.0 mL に溶解し、腎臓の添加回収試験試料は、同様に 5.0 mL に溶解して、誘導体化用の試料溶液とした。

(2) HPLC 用試料溶液の調製

標準溶液および試料溶液 0.2 mL に *p*-NPH 飽和エタノール溶液 0.1 mL および 10% トリクロル酢酸エタノール溶液 0.2 mL を加えて混和、密栓し、76°C のブロックヒーターで 1 時間加熱した。放冷後、HPLC の移動相 0.5 mL を加えて希釈し、HPLC 用試験溶液とした。

(3) 固相抽出の検討

上記 (2) の固相抽出ミニカラムによる精製の部分のみを以下のように変更し、固相の検討を行った。メタノール、水および EDTA-2Na 飽和液それぞれ 10 mL ずつで洗浄した Sep-Pak C18 (ENV) カートリッジ (ウォーターズ社製) または Sep-Pak tC18 (ENV) カートリッジ (ウォーターズ社製) を用いて、大口らの方法⁸⁾に従って精製処理を行った。同様に、メソッド開発の簡素化を目的としたオアシスシリーズの HLB カートリッジ (ウォーターズ社製) と、SPCM が陰イオン化することを考えてオアシス MCX カートリッジ (ウォーターズ社製) についても試みた。定法に従って、オアシス HLB はメタノール、水それぞれ 10 mL で洗浄後、抽出液を負荷し、5% メタノール 2 mL で洗浄後、メタノール 3 mL で溶出した。オアシス MCX は抽出液を負荷し、0.1 mol/L 塩酸 5 mL およびメタノール 5 mL で洗浄後、5% アンモニア加メタノール液 3 mL で溶出した。さらに、Sep-Pak Plus PS-2 カートリッジについては、1 連と 2 連での検討を行った。

(4) 添加回収試験

添加回収試験は、コントロール試料に SPCM を残留基

準値の濃度となるように、筋肉には 0.50 μg (力価)/g、肝臓および脂肪には 2.00 μg (力価)/g、腎臓には 5.00 μg (力価)/g をそれぞれ添加して、試料と同様の操作を行い、回収率を求めた ($n=3$)。

結果および考察

1. ミニカラムによる精製法の検討

ブタの添加回収試験試料を用いた各ミニカラムによる精製方法の検討結果を Table 1 に示し、Sep-Pak Plus PS-2 を 2 連で用いた結果を Table 2 に示した。Sep-Pak C18 (ENV) を用いた肝臓での添加回収試験では、不純物の妨害ピークが見られたため、詳しい検討を行わなかった。Sep-Pak tC18 (ENV) を用いた場合には、水の洗浄液中に SPCM が溶出し、回収率は低かった。オアシス HLB およびオアシス MCX においては、洗浄液中には SPCM は溶出しなかったが、回収率は低かった。Sep-Pak Plus PS-2 では回収率が比較的良好であったが、1 連では回収率が十分ではなかった (Table 1) ので、2 連で使用したところ、回収率はほぼ満足する値となった (Table 2)。この場合の溶出液として 0.01 mol/L と 0.001 mol/L の塩酸を検討したところ、差がなかったため 0.001 mol/L 塩酸を用いた。溶出液の量は、10 および 15 mL で検討したところ、10 mL では溶出操作後のミニカラムを 50% メタノールで洗浄した洗浄液中に SPCM が溶出したが、15 mL では溶出しなかったことより、15 mL とした。

2. 検 量 線

SPCM 標準溶液、発色試薬のみ、ニワトリおよびブタのコントロールおよび添加回収のクロマトグラムを Fig. 2 に示した。SPCM の保持時間は、13.5 分であった。

Table 1. Recoveries of Spectinomycin from Spiked Swine Tissues Using Sep-Pak tC18 (ENV), Oasis HLB, Oasis MCX and Sep-Pak Plus PS-2 Cartridge for Solid-Phase Extraction

Solid phase	Recovery $\pm$ CV (%)		
	Liver	Kidney	Muscle
Sep-Pak tC18 (ENV)	68.5 $\pm$ 8.9	—	—
Oasis HLB	69.6 $\pm$ 1.9	—	—
Oasis MCX	6.6 $\pm$ 5.1	—	—
Sep-Pak Plus PS-2 (single)	71.7 $\pm$ 8.1	78.1 $\pm$ 14.3	70.9 $\pm$ 9.9

$n=3$, —: no datum

Table 2. Recoveries of Spectinomycin from Spiked Chicken and Swine Tissues

Tissue	Concentration spiked (μg (potency)/g)	Chicken		Swine	
		Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)
Muscle	0.5	77.4	5.1	83.8	9.1
Liver	2.0	97.3	1.4	79.3	9.8
Kidney	5.0	97.4	4.1	74.5	6.8
Fat	2.0	87.3	1.8	91.8	3.8

$n=3$

SPCM の検量線は、0.25～10.0 μg (力価)/mL の範囲で高い相関係数 ($r=0.9999$) となり、良好な直線性を示した。

3. 添加回収試験

検量線の直線性が 15.0 μg (力価)/mL 以上では失われてしまうため、添加回収試験の 0.1 mol/L リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) による最終溶解量は、脂肪および肝臓では 2.0 mL、腎臓では 5.0 mL として、誘導体化用の試料とした。薬剤無添加の試料で飼育したニワトリおよびブタから採取したコントロールの組織 2.0 g に SPCM を添加回収した

回収率と変動係数を Table 2 に示した。回収率は 70% 以上で、変動係数が 10% 以内であり、残留分析法として満足できる値が得られた。本法による検出限界は、0.02 μg (力価)/g ($S/N=3$) であった。

4. 動物試験

試験中に一般症状の観察を行った結果、異常は観察されなかった。ニワトリの平均増体率は、投薬期間は 21.5 g/日、休薬期間は 33.8 g/日であり、ブタの平均増体率は、投薬期間は 1.10 kg/日、休薬期間は 0.95 kg/日であった。また、ニワトリの 1 日 1 羽当たりの平均薬剤摂取量は、SPCM として 40.3 mg(力価)であり、ブタの 1 日 1 頭当たりの平均薬剤摂取量は、SPCM として 276.7 mg(力価)であった。

各組織中の SPCM 濃度の分析結果を Table 3 に示した。ニワトリの脂肪の 1 例から 0.020 μg (力価)/g およびブタの腎臓の 1 例から 0.022 μg (力価)/g の SPCM が検出された。しかしこの数値は、残留基準値の 100 から 200 分の 1 程度と低く、また、その他の臓器からはすべて検出限界以下 ($<0.02 \mu\text{g}$ (力価)/g) であった。以上の結果から、ニワトリおよびブタに SPCM 製剤を用法用量の最大投与量で最長の投与期間投与した後、現在の使用禁止期間経過後にと殺した場合に、それぞれの動物の筋肉、肝臓、腎臓および脂肪中の SPCM 濃度は、残留基準値以下であることが確かめられた。

ま と め

SPCM の用法用量に従った場合の使用禁止期間の確認を行うことを目的として、SPCM の残留試験法の検討を行った。抽出に Sep-Pak Plus SP-2 カートリッジを用い、0.001 mol/L の塩酸溶液で溶出することで、きょう雑物の少ない試料での HPLC を確立した。この方法を用いて、市販の SPCM 製剤を用法用量に従ってニワトリおよびブタに投与し、休薬期間経過後にと殺し、採取した筋肉、肝臓、腎臓および脂肪の SPCM 残留濃度は、すべて残留基

Fig. 2. Typical chromatograms of standard solution of spectinomycin (1.0 μg (potency)/mL) (A), only pre-column derivatization reagent (B), extract of chicken liver (C) and chicken liver with 2.0 μg (potency)/g of spectinomycin (D), extract of swine liver (E) and swine liver with 2.0 μg (potency)/g of spectinomycin (F)

Table 3. Results of Residue Assay in Various Tissues of Chickens and Swine after Oral Administration of Spectinomycin-HCl *via* Drinking Water or *via* Food Mixture

Chicken No.	Muscle	Liver	Kidney	Fat
1	<0.02	<0.02	<0.02	0.020
2	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
3	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
Mean	ND	ND	ND	0.007
Swine No.	Muscle	Liver	Kidney	Fat
1	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
2	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
3	<0.02	<0.02	0.022 (± 0.004)	<0.02
Mean	ND	ND	0.007	ND

$n=3$, mean ($\pm$ S.D.)

Unit: μg spectinomycin (potency)/g

ND: below the determination limit

準値の1/100～1/200程度の低い値もしくは検出限界(0.02 μ g(力価)/g)以下であることが確認された。

文 献

- 1) 農林水産省令第42号(1980)“動物用医薬品の使用の規制に関する省令”昭和55年9月30日。
- 2) Hanka, L. J., Mason, D. J., Sokoliski, W. T., Actinospectacin, A new antibiotic, II microbiological assay. *Antibiot. Chemotherapy*, **11**, 123-126 (1961).
- 3) 厚生省薬務局監修, 日本抗生物質学術協議会“日本抗生物質医薬品基準解説”東京, 薬業時報社, 1993, p. 167-168.
- 4) Brown, L. W., Bowman, P. B., Gas chromatographic assay for the antibiotic spectinomycin. *J. Chromatogr. Sci.*, **12**, 373-376 (1974).
- 5) Tuji, K., Jenkins, K. M., Derivatization for secondary amines with 2-naphthalene-sulfonyl chloride for high-performance liquid chromatographic analysis of spectinomycin. *J. Chromatogr. A*, **333**, 365-380 (1985).
- 6) Burton, S. D., Hutchins, J. E., Fredericksen, T. L., Ricks, C., Tyczkowski, J. K., High-performance liquid chromatographic method for the determination of spectinomycin in turkey plasma. *J. Chromatogr. A*, **571**, 209-216 (1991).
- 7) Haagsma, N., Keegstra, J. R., Scherpenisse, P., High-performance liquid chromatographic determination of spectinomycin in swine, calf and chicken plasma. *J. Chromatogr. A*, **615**, 289-295 (1993).
- 8) Ohguchi, K., Takahara, H., Matsumoto, M., Nakajima, C., Kido, Y., Residue analysis of spectinomycin in chicken and swine tissue by HPLC. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **37**, 319-324 (1996).
- 9) Hornish, R. E., Wiest, J. R., Quantitation of spectinomycin residues in bovine tissues by ion-exchange high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and confirmation by reversed-phase high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **812**, 123-133 (1998).
- 10) McLaughlin, L. G., Henion, J. D., Kijak, P. J., Multi-residue confirmation of aminoglycoside antibiotics and bovine kidney by ion spray high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.*, **23**, 417-429 (1994).
- 11) 農林水産省告示第1123号(1999)“動物用抗生物質医薬品基準”平成11年8月30日。